

佩妃延腹小蜂属榕小蜂 CYP6 家族进化分析

刘 英¹, 万东光¹, 孙 铮¹, 肖金花², 黄大卫^{1,2,*}

(1. 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018; 2. 中国科学院动物研究所, 北京 100080)

摘要: 采用 PCR 方法获得了佩妃延腹小蜂属 *Philotrypesis* 榕小蜂 9 条 CYP6 基因片段: *CYP6CK1*, *CYP6AQ2*, *CYP6AQ3*, *CYP6AS20*, *CYP6AS21*, *CYP6AS22*, *CYP6AS23*, *CYP6AS24* 和 *CYP6AS25*。这些基因序列都包含编码蛋白疏水螺旋区 I 和血红素结合域的区域。使用 MEGA 4.0 构建基因树, 用 PAML 4.0 检测选择压力。结果表明: 榕小蜂的 CYP6AS, CYP6AQ, CYP6CK 基因亚家族的扩张可能是在自然选择下通过基因复制方式完成的。基于最大似然法的位点特异性模型对蛋白编码序列选择压力检测发现: 榕小蜂 CYP6AS 亚家族的基因接受净化选择, 在氨基酸序列上表现出较高的保守性。

关键词: 佩妃延腹小蜂属; 细胞色素 P450; CYP6 基因家族; 基因复制; 净化选择

中图分类号: Q78, Q961 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2008)08-0849-06

Evolutionary analysis of CYP6 genes of *Philotrypesis* spp. (Hymenoptera: Chalcidoidea: Pteromalidae)

LIU Ying¹, WAN Dong-Guang¹, SUN Zheng¹, XIAO Jin-Hua², HUANG Da-Wei^{1,2,*} (1. Plant Protection College, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: Nine new DNA fragments encoding cytochrome P450 were amplified from the fig wasps *Philotrypesis* spp.: *CYP6CK1*, *CYP6AQ2*, *CYP6AQ3*, *CYP6AS20*, *CYP6AS21*, *CYP6AS22*, *CYP6AS23*, *CYP6AS24* and *CYP6AS25*. These sequences include helix I and heme-binding regions which are important functional regions for all P450 genes. We employed MEGA 4.0 to construct gene tree and PAML 4.0 to test the selection pressure on the encoding region. The results showed that the expansion of CYP6AS, CYP6AQ and CYP6CK subfamilies might be produced by the events of gene duplication. Members in the CYP6AS subfamily from those fig wasps are suffering from purifying selection, and the encoding regions are highly conservative.

Key words: *Philotrypesis*; cytochrome P450; CYP6 family; gene duplication; purifying selection

细胞色素 P450(cytochrome P450)是一个古老的基因超家族, 它们起源于一个共同的祖先(Nebert *et al.*, 1989)。其中, CYP6 是细胞色素 P450 基因超家族的一个家族, 它们是昆虫中特有的, 其蛋白产物在对异源物质包括植物次生物质、植物毒素、杀虫剂、环境有毒物质等代谢中起着很重要的作用(Feyereisen, 1999)。不同的细胞色素 P450 基因都存在一些保守区, 这些保守区可能在所有 P450 基因功能方面发挥共同的重要作用; 同时, P450 基因又表现出明显的多样性, 主要体现在其可变区。在保守

区净化选择可能占优势, 而可变区的变异则主要来源于适应性进化和中性随机漂变(Degtyarenko and Archakov, 1993), 这些变异增加了 P450 蛋白催化底物的多样性, 进而增强了生物体对多变环境的适应性(Graham-Lorence and Peterson, 1996)。Thomas (2007)借助 PAML3.14 软件在分子水平上证明了一些系统发生不稳定的基因家族成员符合适应性进化, 有些功能关键氨基酸接受正向选择(Thomas, 2007)。

基因复制是产生具有新功能的基因和基因家族

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570970, 30770302); 科学技术部科技基础性工作专项重点项目(2006FY110500); 国家基础科学人才培养基金(NSFC-J0630964/J0109)

作者简介: 刘英, 女, 1983 年生, 山东人, 硕士研究生, 研究方向为基因进化, E-mail: yingying0013@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: huangdlw@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2008-04-17; 接受日期 Accepted: 2008-06-08

多样性的主要原因之一。在对基因家族进化分析中,通过基因复制事件产生的基因家族成员往往遭遇正向选择驱使的快速、适应性进化,在这方面对基因家族进化的研究是一种新趋势(Shakhnovich and Koonin, 2006)。非同义-同义置换速率比值(d_N/d_S)是密码子水平评价选择压力的一项灵敏指标, d_N/d_S 比值(ω) = 1, < 1 和 > 1 分别表示中性进化、净化选择和正选择作用(即适应性进化)。基于最大似然法的“位点特异性”模型(site-specific model)在检测给定基因正选择时有较高的检验效力(Yang, 2000)。

在榕树-榕小蜂共生体系中,榕树为榕小蜂提供食物和栖息环境,榕小蜂为榕树传粉实现其种群的繁衍,这个体系是研究植物与昆虫精细适应、毒力进化等进化学问题的理想材料(Jiang *et al.*, 2006a)。在直径只有几个厘米大小的榕果(榕树的果状隐头花序)里生活着一种专一地榕树传粉的传粉榕小蜂,还有几种乃至几十种非传粉榕小蜂。榕小蜂由于长期生活在榕果里,它们的外部形态特征、内部生理等都发生了很多适应性的变化(Machado *et al.*, 2001)。

细胞色素 P450 酶系在昆虫与其寄主植物相互关系中发挥重要的作用,其中 CYP6 家族基因的代谢解毒作用是大多数昆虫适应其寄主植物的主要机制(Li *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2002; Pellmyr and Krenn, 2002)。迄今为止,榕小蜂的 CYP6 家族基因还没有报道。因此,我们旨在获得非传粉榕小蜂佩妃延腹小蜂属 *Philotrypesis* 若干物种的 CYP6 家族基因成员并了解其特点。在此基础上,集中讨论下面两个问题:(1)生活在这种特殊环境里的 *Philotrypesis* spp., 其 CYP6 亚基因家族成员扩张(expansion)是否是通过基因复制?(2)由于生活环境的特殊性,我们获得的 CYP6 基因片段编码的氨基酸不同位点选择压力存在怎样的差异,以及它们的进化式样是怎样的?

1 材料与方法

1.1 试验材料和主要试剂

佩妃延腹小蜂属 *Philotrypesis* spp. 隶属膜翅目(Hymenoptera)小蜂总科(Chalcidoidea)金小蜂科(Pteromalidae),是仅生活在榕果内的非传粉榕小蜂。本实验选用短尾佩妃延腹小蜂 *Philotrypesis pilosa* 和 4 种未定种名榕小蜂: *P. sp.*, *P. sp.1*, *P. sp.4* 和 *P. sp.5* 为试验材料,其中, *P. pilosa* 和 *P. sp.* 出自

对叶榕 *Ficus hispida* (Peng *et al.*, 2005); *P. sp.1*, *P. sp.4* 和 *P. sp.5* 出自垂叶榕 *Ficus benjamina* (白莉芬等, 2006),皆于 2006 年 11 月采自海南省儋州市,采集人牛黎明和胡好远。采集的新鲜昆虫标本冷冻保存(-20℃)于 95% 的酒精中备用。

实验中使用的 EasyTaq DNA 聚合酶、PEasy-T1 载体等均购自北京全式金(Transgen, Beijing)生物技术有限公司。

1.2 DNA 提取

在 DNA 提取前,标本先用 TE 缓冲液冲洗。选取每个种单头雌虫标本用来提取基因组 DNA,提取方法采用标准酚-氯仿方法,具体步骤参照 Jiang 等(2006b)提取榕小蜂 DNA 的方法。

1.3 榕小蜂 P450 基因的克隆

尽管 P450 基因遗传多样性明显,但是所有的 P450 基因在氨基酸水平上都有一个相对保守的血红素结合区域,即 F-X-X-G-X-X-C-X-G 结构(Degtyarenko, 1995)。我们通过 P450 网站(<http://dmelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>)下载 CYP6AS 亚家族的氨基酸序列,用 BioEdit 7.0 软件进行序列比对后,找到了另外两个保守区 TSGKLKE (139 ~ 145, 位置根据 *A. mellifera* CYP6AS7)、AGFETSS(303 ~ 309, 同上),利用 Oligo 6.0 软件为血红素结合区域设计了 4 条简并引物,引物碱基组成及在 CYP6AS7 相应位置如表 1,其中引物 CYP6-R1 参考了 Tares 等(2000)扩增卷叶蛾赤眼蜂 *Trichogramma cacoeciae* P450 基因的引物。所有引物均由北京博尚(Biosune, Beijing)生物技术有限公司合成。

PCR 反应采用 25 μ L 反应体系,其中含有 2.0 μ L DNA 溶液, 2.5 μ L 10 $\times$ EasyTaq buffer, 4 μ L 2.5 mmol/L dNTP 混合液,引物(10 μ M/L)1.5 ~ 2.0 μ L, EasyTaq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.5 μ L,用灭菌水补充体积至 25 μ L。反应条件为: 94℃ 变性 5 min; 94℃ 30 s, 52℃ 50 s, 72℃ 1 min, 35 个循环后 72℃ 保温 10 min。表 1 为扩增 CYP6 基因所用的引物及相应位置。

PCR 产物于含有溴化乙锭(ethidium bromide, EB)的 1% 琼脂糖凝胶中电泳,电泳结束后在紫外光下检测结果并拍照。纯化后的目的片段与连入 Peasy-T1 载体上,连接后再转化到 DH5 α 感受态大肠杆菌中,通过蓝白斑筛选,挑取每个片段的阳性克隆,用通用引物 M13F 与 M13R 进行菌落 PCR 检测,挑选 5 ~ 7 个阳性克隆送北京博尚生物技术有限公司。

司进行测序。测序反应用 M13F 与 M13R 测序引物 在 3770 测序仪上进行。

表 1 引物序列和其在 CYP6AS7 的位置

Table 1 Primers and locations used for sequencing of our CYP6 genes		
引物 Primers	引物序列 Primer sequences (5' – 3')	在 CYP6AS7 的位置 Location in CYP6AS7
CYP6-F1	TCYRGYAAACTBAARGARATGTTC	TSGKLKE(139 – 145)
CYP6-R1	TYGWHGAYGAYGTTTCRAADCCAG	F-XX-G-XXX-C-X-G
CYP6-F2	TTCTTCVYTGCTGGWTTTGA	AGFETSS(303 – 309)
CYP6-R2	CCVTTTCWSSGCGYGGNCCSCG	F-XX-G-XXX-C-X-G

1.4 数据下载

我们通过 *Nasonia vitripennis* 和 *Apis mellifera* 的 P450 基因网站 (<http://drnelson.utmem.edu/Nasonia.htm>; <http://drnelson.utmem.edu/honeybee.html>) 下载了它们的 CYP6 家族基因序列。*A. mellifera*: *CYP6AQ1*, *CYP6AS1*, *CYP6AS3*, *CYP6AS15*, *CYP6AS4*, *CYP6AS5*, *CYP6AS7*, *CYP6AS10*, *CYP6AS13*, *CYP6AS18*; *N. vitripennis*: *CYP6AS27*, *CYP6AS29*, *CYP6AS31*, *CYP6AS32*, *CYP6AQ7*, *CYP6AQ8*, *CYP6AQ9*, *CYP6CK4*, *CYP6CK6*, *CYP6CK8*, *CYP6AS33*, *CYP6AS35*。

1.5 数据分析方法

1.5.1 构建系统发育树: *CYP6AQ1*, *CYP6AS27*, *CYP6AS29*, *CYP6AS31*, *CYP6AS32*, *CYP6AQ7*, *CYP6AQ8*, *CYP6AQ9*, *CYP6CK4*, *CYP6CK6* 和 *CYP6CK8* 与 榕小蜂的 *CYP6AQ3*, *CYP6AQ2*, *CYP6AS25*, *CYP6AS23*, *CYP6AS24*, *CYP6AS22* 和 *CYP6CK1* 序列用 ClustalX 1.83 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/RevTrans/>) (Chenna *et al.*, 2003) 在线比对, 截取等长为 408 bp, 用 Mega 4.0 建树, 采用邻近结合法 Neighbor-Joining (NJ) (参数设置: Phylogeny test and options: 1 000; Model: Kimura 2-parameter; Gap/Missing data: Pairwise Deletion; Pattern among lineages: Homogeneous; Rates among sites: Different a = 0.8) 和最大简约法 Maximum Parsimony (MP) (参数设置: Phylogeny test and options: 1 000; Search model: close-neighbor-interchange with search level 1; Gap/Missing data: Complete Deletion)

1.5.2 用 PAML 4.0 来对 CYP6AS 亚家族基因蛋白编码序列选择压力的检测: 采用 *A. mellifera* (*CYP6AS1*, *CYP6AS3*, *CYP6AS15*, *CYP6AS4*, *CYP6AS5*, *CYP6AS7*, *CYP6AS10*, *CYP6AS13*, *CYP6AS18*), *N. vitripennis* (*CYP6AS27*, *CYP6AS29*, *CYP6AS31*, *CYP6AS32*, *CYP6AS33*, *CYP6AS35*), *P. pilosa* (*CYP6AS20*), *P. sp.* (*CYP6AS21*), 以上编码区序列比对, 截取与 *CYP6AS20*, *CYP6AS21* 等长为

888 个核苷酸, 编码 296 个氨基酸, 利用 PhyIip 软件建 NJ 树, 采用“位点特异性”模型下的各种密码子置换模型来计算每个位点上的 $d_N/d_S(\omega)$ 。序列中如果某个氨基酸位点的 $\omega > 1$ 表明, 非同义置换比同义置换更容易被固定, 即蛋白进化是正选择驱动的结果。最简单的模型 M0 假定各位点都有同样的 ω 值; M1a 模型(近似中性模型)将密码子分为两类: 一类是位点 (P_0) 所编码的氨基酸几乎没有变化 ($0 < \omega_0 < 1$), 而另一类位点 (P_1) 为中性进化位点 ($\omega_1 = 1$); M2a 模型(选择模型)则考虑正选择, 在 M1a 模型基础上又增添了第 3 类位点, 此类位点 (P_2) 所预测的 ω_2 可以大于 1; 在 M3 模型(离散模型)中, 每个位点的范围可以是 3 类位点中的任一种, 该模型认为各个位点上的 ω 可以不同; M7 和 M8 模型均采用离散 β 分布来估计每个位点的 ω 值, 并通过参数 p 和 q 来描述 β 分布, M8 和 M7 的不同之处在于 M8 增添了一类 $\omega > 1$ 的位点, 也可用于检测正选择(Yang and Swanson, 2002)。我们首先计算出每个模型的最佳似然值, 由于最佳似然值差异的 2 倍 ($2\Delta L$) 基本遵循卡方分布, 所以我们可以对其执行自由度为两个模型自由参数之差的卡方检验, 即似然比检测 (likelihood ratio test, LRT) (Yang and Swanson, 2002)。本文分别对 M0 和 M3, M1a 和 M2a 以及 M7 和 M8 模型进行成对比较, 用 PAML 4.0 (<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>) 软件包中的 *codeml* 程序对蛋白编码序列不同位点选择压力进行检测。

2 结 果

2.1 序列获得

对所得序列 NCBI 网站进行 tblastx 比对, 我们克隆获得的序列与 CYP6 基因家族基因有很高的同源性, 提交 P450 命名委员会 (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>), 其命名和 GenBank 登录号如表 2。 *CYP6AQ3*, *CYP6AQ2*, *CYP6AS25*,

CYP6AS23, *CYP6AS24*, *CYP6AS22* 和 *CYP6CK1* 为 *CYP6* 基因的中间片段,包括细胞色素 P450 蛋白疏水螺旋区 I (helix I) 和编码血红素结合域;*CYP6AS20* 和 *CYP6AS21* 基因片段编码 296 个氨基酸,包括 SRS2(substrate recognition sites,底物结合位点),SRS3,SRS4,SRS5,蛋白疏水螺旋区 I 和血红素

结合域。*CYP6AS20* 和 *CYP6AS21* 基因片段内含子长度和位置相同。*CYP6AS23* 和 *CYP6AS24* 基因片段内含子在长度上和位置相同。各序列内含子两端均符合“GT-AG”法则。*P. sp.1* 体内发现 *CYP6CK* 亚家族的成员,而在蜜蜂基因组内没有发现 *CYP6CK* 亚家族基因成员。

表 2 本研究克隆序列的名称及特征

Table 2 Nomenclature and features of CYP6 genes in this study					
物种 Species	片段名称 Fragment name	GenBank 登录号 GenBank accession no.	片段长度(bp) Length	编码区(bp) Encoding region	内含子长度(bp) Intron length
<i>P. pilosa</i>	<i>CYP6AS20</i>	EU660213	1071	888	85/98
<i>P. sp.</i>	<i>CYP6AS21</i>	EU660214	1071	888	85/98
<i>P. sp.1</i>	<i>CYP6AS22</i>	EU660212	508	423	85
<i>P. sp.4</i>	<i>CYP6CK1</i>	EU661087	492	420	72
	<i>CYP6AS23</i>	EU660209	496	423	73
	<i>CYP6AS24</i>	EU660210	496	423	73
	<i>CYP6AS25</i>	EU660211	496	423	73
	<i>CYP6AQ2</i>	EU661088	520	408	112
<i>P. sp.5</i>	<i>CYP6AQ3</i>	EU661089	535	423	112

2.2 系统进化分析

基于 NJ 法和 MP 法构建的基因树在拓扑结构上是一致的,我们选取了 MP 树如图 1。基因树在拓扑结构上显示不同物种的同一 *CYP6* 亚家族的成员高支持率地聚成一支,可能 *CYP6AS*, *CYP6AQ* 和 *CYP6CK* 这 3 个亚家族基因在进化历史早期发生了

基因复制事件。在基因树 *CYP6AS* 分支上,在 *CYP6AS20* (*P. pilosa*)/*CYP6AS21* (*P. sp.*)/*CYP6AS22*(*P. sp.1*)/*CYP6AS23*(*P. sp.4*)形成一支,bootstrap 值为 100,可能在这些物种形成之前发生过基因复制事件。*P. pilosa* *CYP6AS20* 和 *P. sp. CYP6AS21* 以很高的支持率聚在一起,进一步支持它

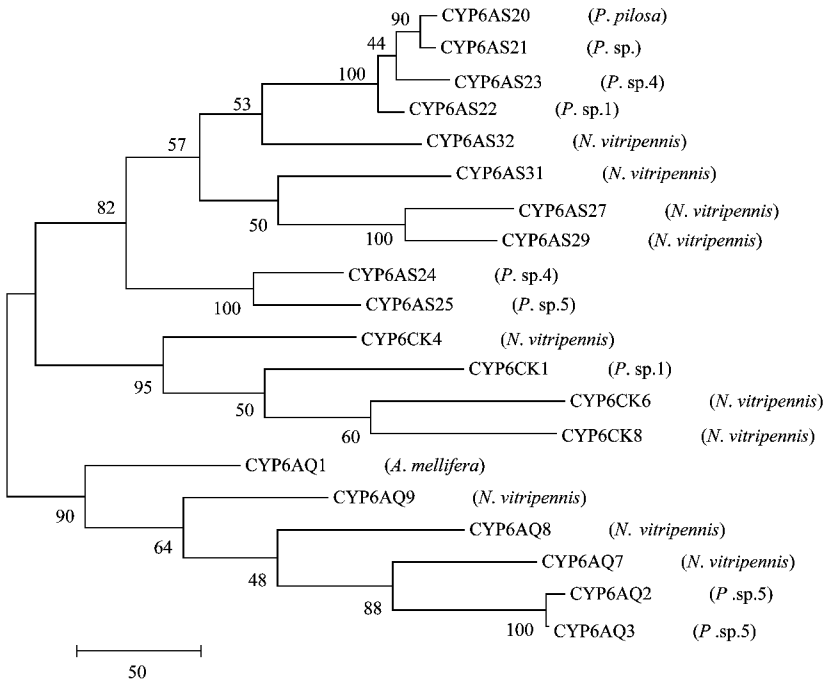


图 1 昆虫 CYP6AS, CYP6 AQ 和 CYP6CK 亚家族基因核苷酸序列推断的基因树

Fig. 1 Gene tree of CYP6 gene family deduced from partial sequences of CYP6AS, CYP6 AQ and CYP6CK subfamilies 内支上下方的数值为 bootstrap 值。The numbers on internal branches are bootstrap values.

们是一对姊妹种(Jiang *et al.*, 2006b)。

2.3 CYP6AS 亚家族蛋白编码序列的选择压力检测

我们使用 PAML 4.0 软件中的 codeml 程序来检测该基因家族中是否存在受到正选择的氨基酸位点。似然比检验结果显示模型两两比较均不显著,说明没有检测到 $\omega > 1$ 的氨基酸位点,即我们分析的基因片段整体上接受净化选择。

3 讨论

在扩增 *P. sp.4* 和 *P. sp.5* 的 P450 基因时,我们发现同一 PCR 扩增的单一一条带经过纯化、转化和测序,却得到了不同的 P450 基因,如果进行大范围的阳性克隆测序可能会得到更多的 P450 的基因片段,这体现出榕小蜂 P450 基因超家族多样性的特点。虽然我们得到的 P450 序列只有总长度的三分之一,但序列中含有 P450 的 3 个关键保守区 ETLR, PERF 和血红素铁结合区域,这三个区域在 P450 基因中普遍存在的,一直认为是 P450 家族成员鉴定的标志,还含有编码蛋白疏水螺旋区 I 区域。通常认为含有编码蛋白疏水螺旋区 I 和编码血红素结合域的 P450 基因片段具有较高的 SDI 值(segmental divergence index),能够反应其全长基因的性质,可以用来研究基因家族的进化(Fogleman and Danielson, 2000)。我们克隆得到的基因片段包括了上述特征,因此,基于我们试验得到的基因片段获得的系统发育树有比较高可靠性。

基因复制事件是分子水平上重要的进化事件(Moore and Purugganan, 2003)。前人的研究证明,细胞色素 P450 基因超家族成员的扩张主要是通过基因复制,CYP6AS, CYP6AQ 和 CYP6CK 这三个亚家族在进化历史的早期发生过基因复制事件,产生了新成员,由于不同位点自然选择压力不同,新成员在进化过程中,产生了序列变化和功能分化,使其更好的适应外界环境(Richards, 2008)。在意大利蜜蜂体内,CYP6AS 亚家族在染色体上紧密排列,并且都包括 4 个内含子,位置非常保守,证明 CYP6AS 亚家族是基因复制的产物(Claudianos *et al.*, 2006; Feyereisen, 2006)。通过复制事件出现的基因有不同的命运(Lynch and Conery, 2000)。由于突变,而获得新的功能,这种新的功能有利于适应变化的环境,而被正向选择作用驱动固定在种群中,提高个体的适合度(fitness)(Francino, 2005)。假基因化,可以解

释在 P450 基因超家族中有若干假基因的现象(Tijet *et al.*, 2001)。通过 *N. vitripennis* 和 *A. mellifera* 基因组数据分析发现在 CYP6AS, CYP6CK 和 CYP6AQ 亚家族中都有 1~2 个假基因成员。由于我们没有得到榕小蜂 9 个 P450 基因的全长序列,因此还不能排除这些基因是假基因的可能性。

CYP6AS 亚家族蛋白编码序列的选择压力检测结果显示, *CYP6AS20* 和 *CYP6AS21* 这段区域整体上接受净化选择。这可能有两个方面的原因,CYP6 基因编码的蛋白参与了其寄主植物次生物质和有毒物质的解毒代谢,使昆虫更好地适应寄主植物(Martin *et al.*, 2002)。 *CYP6AS20* 和 *CYP6AS21* 亚家族这段区域对基因正常发挥功能很重要,表现出氨基酸序列较高的保守性。在分析同源性较高的基因时,我们选择的模型可能对数据处理过于严谨,以致于当选择作用微弱或短暂时,可能会丢失一些正选择位点,不能有效鉴定基因的适应性进化(Yang, 2000)。

致谢 中国科学院动物研究所牛黎明博士和胡好远博士采集了本实验用到的榕小蜂标本,南昌大学生命科学学院陶敏硕士在 PAML 软件使用和数据运算中给予了大量建议和帮助,特致衷心感谢!

参 考 文 献 (References)

- Bai L, Yang D, Shi Z, Peng Y, Zhai S, 2006. Community structure of fig wasp in *Ficus benjamina* in different habitats. *Biodiversity Science*, 14 (4): 340–344. [白莉芬, 杨大荣, 石章红, 彭艳琼, 翟树伟, 2006. 垂叶榕隐头果内小蜂群落结构与生境关系的初步研究. 生物多样性, 14 (4): 340–344]
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD, 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, 31 (13): 3 497–3 500.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG, 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15 (5): 615–636.
- Degtyarenko KN, 1995. Structural domains of P450-containing monooxygenase systems. *Protein Engineering*, 8(8): 737–747.
- Degtyarenko KN, Archakov AI, 1993. Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS Letters*, 332 (1–2): 1–8.
- Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44 (1): 507–533.
- Feyereisen R, 2006. Evolution of insect P450. *Biochemical Society Transactions*, 34 (6): 1 252–1 255.
- Fogleman JC, Danielson PB, 2000. Analysis of fragment homology among DNA sequences from cytochrome P450 families 4 and 6. *Genetica*, 110 (3): 257–265.

- Francino MP, 2005. An adaptive radiation model for the origin of new gene functions. *Nature Genetics*, 37 (6): 573–578.
- Graham-Lorence S, Peterson JA, 1996. P450s: structural similarities and functional differences. *FASEB Journal*, 10 (2): 206–214.
- Jiang ZF, Huang DW, Zhu CD, Zhen WQ, 2006a. New insights into the phylogeny of fig pollinators using Bayesian analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38(2): 306–315.
- Jiang ZF, Huang DW, Chen LL, Zhen WQ, Fu YG, Peng ZQ, 2006b. Rampant host switching and multiple female body colour transitions in *Philotrypesis* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Agaonidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 19 (4): 1 157–1 166.
- Li XC, Schuler MA, Berenbaum MR, 2002. Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome P450 genes. *Nature*, 419 (6 908): 712–715.
- Lynch M, Conery JS, 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 290 (5 494): 1 151–1 155.
- Machado CA, Jousset E, Kjellberg F, Compton SG, Herre EA, 2001. Phylogenetic relationships, historical biogeography and character evolution of fig-pollinating wasps. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 268 (1 468): 685–694.
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D, 2002. From the Cover: Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (19): 12 246–12 251.
- Moore RC, Purugganan MD, 2003. The early stages of duplicate gene evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (26): 15 682–15 687.
- Nebert DW, Nelson DR, Feyereisen R, 1989. Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica*, 19 (10): 1 149–1 160.
- Pellmyr O, Krenn HW, 2002. Origin of a complex key innovation in an obligate insect-plant mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (8): 5 498–5 502.
- Peng YQ, Yang DR, Wang QY, 2005. Quantitative tests of interaction between pollinating and non-pollinating fig wasps on dioecious *Ficus hispida*. *Ecological Entomology*, 30 (1): 70–77.
- Richards S, 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452 (7 190): 949–955.
- Shakhnovich BE, Koonin EV, 2006. Origins and impact of constraints in evolution of gene families. *Genome Research*, 16 (12): 1 529–1 536.
- Tares S, Berge JB, Amichot M, 2000. Cloning and expression of cytochrome P450 genes belonging to the CYP4 family and to a novel family, CYP48, in two Hymenopteran insects, *Trichogramma cacoeciae* and *Apis mellifera*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268 (3): 677–682.
- Thomas JH, 2007. Rapid birth-death evolution specific to xenobiotic cytochrome P450 genes in vertebrates. *PLoS Genetics*, 3 (5): 67–74.
- Tijet N, Helvig C, Feyereisen R, 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*, 262(1–2): 189–198.
- Yang Z, 2000. Maximum likelihood estimation on large phylogenies and analysis of adaptive evolution in human influenza virus. *Journal of Molecular Evolution*, 51(5): 423–432.
- Yang Z, Swanson WJ, 2002. Codon-substitution models to detect adaptive evolution that account for heterogeneous selective pressures among site classes. *Molecular Biology and Evolution*, 19 (1): 49–57.

(责任编辑: 袁德成)